昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, February 2016, 59(2): 127 – 137　　doi:10.16380/j.kcxb.2016.02.002

高温对西花蓟马卵巢发育及卵黄蛋白含量的影响

马亚斌[1]，孙丽娟[1]，李洪刚[2]，王思芳[1]，张　彬[1]，郑长英[1,*]，万方浩[1,3]

（1. 青岛农业大学农学与植物保护学院，山东省植物病虫害综合防控重点实验室，山东青岛 266109；
2. 山东省农药检定所，济南 250100；3. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要：【目的】为探明短时高温热激后西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 生殖力和卵巢发育的相互关系。【方法】选择 1 龄、2 龄若虫，预蛹，蛹和 1 日龄成虫，采用不同高温(41 和 45℃)短时(2 h)处理，观察卵巢发育及卵黄蛋白相对含量的变化。【结果】高温热激主要抑制了西花蓟马生殖器官和胚胎的正常发育，导致卵巢管数量减少，卵巢管和胚胎发育畸形；电泳结合不同的染色方法证明西花蓟马的卵黄蛋白为一种磷酸化、糖基化的脂蛋白，由 3 个亚基组成，分子量分别为 116，70 和 47 kDa。除热激蛹期外，热激其他龄期的若虫对其当代成虫卵黄蛋白合成都起到抑制作用，且 45℃热激 1 龄或 2 龄若虫后，其对卵黄蛋白相对含量的影响持续到了 F_1 代。【结论】温度对雌虫生殖力的影响是由于其对生殖器官发育和卵黄蛋白合成的影响引起的。本研究为西花蓟马的卵黄蛋白和卵黄发生的进一步研究奠定了基础。

关键词：西花蓟马；热激；卵巢；卵黄蛋白；生殖力

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2016)02-127-11

Effects of high temperature on ovary development and yolk protein content of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae)

MA Ya-Bin[1], SUN Li-Juan[1], LI Hong-Gang[2], WANG Si-Fang[1], ZHANG Bin[1], ZHENG Chang-Ying[1,*], WAN Fang-Hao[1,3] (1. Key Laboratory of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; 2. Shandong Institute for the Control of Agrochemicals, Jinan 250100, China; 3. Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Aim】This study aims to clarify the relationship between fecundity and ovary development of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). 【Methods】The 1st instar nymphs, 2nd instar nymphs, prepupae, pupae, and the 1-day-old adults were subjected to 41℃ and 45℃ heat shock, respectively, for 2 h and the changes in their ovary development and relative contents of yolk protein were observed. 【Results】The normal development of reproductive organs and embryos of *F. occidentalis* were inhibited by heat exposure, which resulted in the reduction in the number of ovarian tubes and deformity of ovarian tubes and embryo. The yolk protein of *F. occidentalis* was identified as a phosphorylated and glycosylated lipoprotein, consisting of three subunits with the molecular weight of 116, 70 and 47 kDa, respectively, through electrophoresis and different dyeing methods. The yolk protein synthesis of F_0 generation adults was inhibited when nymphs and prepupae were exposed to high temperature, and the effect of high temperature on the relative content of yolk protein continued to F_1 generation when

基金项目：国家自然科学基金项目(31372003)；青岛市自然基金项目(13-1-4-163-jch)；青岛农业大学研究生创新计划项目(7601214003)；"泰山学者"建设工程专项

作者简介：马亚斌，男，1987 年 5 月生，山东滕州人，硕士研究生，研究方向为昆虫生态及生理学，E-mail：15006587071@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：zhengcy67@qau.edu.cn

收稿日期 Received：2015-09-25；接受日期 Accepted：2016-01-08

the 1st or 2nd instar nymphs were exposed to high temperature (45℃).【Conclusion】The effect of temperature on female fecundity of *F. occidentalis* is due to its influence on the development of reproductive organs and the synthesis of yolk protein. This study lays a foundation for the further research on yolk protein and vitellogenesis of *F. occidentalis*.

Key words: *Frankliniella occidentalis*; heat shock; ovary; yolk protein; fecundity

全球气候变暖是近来国际上关注的热点问题。全球变暖的趋势下,极端高温事件的发生频次和强度也在增加。昆虫是变温动物,受外界环境的影响较大,温度是影响昆虫生长发育与繁殖的最重要环境因子。研究发现,高温胁迫会导致昆虫的繁殖力降低,主要原因可能是由于极端温度破坏了昆虫生殖系统功能和交配行为(Saxena *et al*., 1992; Mahroof *et al*., 2005)。例如,高温能够影响天蚕 *Antheraea yamamai* 雌虫卵巢和卵子的发育,从而导致产卵量的降低(叶恭银等, 2000)。此外,高温还可以影响雄虫的输精管,对精子造成伤害,从而导致其不育(Rinehart *et al*., 2000; 郭慧芳等, 2002)。

卵黄蛋白(yolk protein)是昆虫卵内的营养储备,为发育中的卵子提供营养物质。它的前体主要来源于脂肪体的雌性特异血蛋白——卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)。在大多数昆虫中,卵黄原蛋白由脂肪体合成后,通常通过血淋巴转移到卵巢,由卵母细胞吸收并在卵内沉积为卵黄蛋白,为胚胎发育提供营养和功能性物质(Byrne *et al*., 1989; Falchuk and Montorzi, 2001)。卵黄发生是昆虫生殖过程的关键步骤,昆虫卵黄发生机理和控制的研究是当前昆虫生理学和生物化学最活跃的领域之一(Hagedorn and Kunkel, 1979; 龚和和翟启慧, 1979; Richard *et al*., 1998; 陶淑霞, 2004; 郭建洋, 2010)。研究卵黄蛋白的理化性质是深入研究昆虫卵黄发生及其调控机制的重要步骤。昆虫卵黄蛋白的合成不仅受激素的调控,还受诸多外界因子如营养条件、环境因子等的影响。营养对卵黄蛋白合成的影响在直翅目、膜翅目及蜚蠊目的一些昆虫中已得到了详尽的研究。如饥饿可导致德国小蠊 *Blattella germanica* 卵黄蛋白的合成受到抑制(Woodhead and Stay, 1989)。然而,相对于营养条件而言,温度对昆虫卵黄蛋白的影响研究较少。Ye 等(1999)对天蚕 *Antheraea yamamai* 进行了研究,结果表明,32℃高温热激后对卵黄蛋白合成有明显影响,表现为脂肪体和血淋巴中卵黄蛋白含量明显低于26℃高温热激后的含量;另外,发现温度对卵黄蛋白合成的影响与开始高温处理的蚕体发育阶段相关。衣维贤(2003)研究温度对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 卵黄蛋白含量的影响,结果表明高温对卵黄蛋白的合成产生明显的影响。

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande)是危害园艺作物的世界性害虫,在夏季高温季节危害特别严重。温度对其生长发育与繁殖具有显著的影响(Wang *et al*., 2014; Jiang *et al*., 2014)。那么,高温是否影响西花蓟马的卵巢发育及卵黄蛋白的合成,进而对其繁殖力造成影响?基于此,本研究对西花蓟马的生殖结构及卵黄蛋白含量开展研究,以期为从生理学角度研究高温对西花蓟马种群消长的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 虫源、热激处理及取样

西花蓟马采自青岛农业大学校园内三叶草 *Trifolium repens* 上。在实验室内以紫甘蓝 *Brassica oleracea* 连续饲养多代。室内环境条件:温度 25 ± 1℃,光周期 16L∶8D,相对湿度 50% ~60% 。

在我国,一般来说夏天温室中每天的高温可达到40℃,这对大多数温室作物没有害处。在温室中高温超过40℃通常用来控制病虫害。本实验中,人工气候箱中设置41 和45℃ 2 个温度,分别处理2 h。对照温度为 25℃,相对湿度 55% ± 5%,光周期 16L∶8D。实验虫态为1 龄末若虫、2 龄若虫、预蛹及蛹期虫态。将高温处理后的西花蓟马取出,在 25℃,相对湿度 55% ±5%,光照 16L∶8D 条件下饲养至羽化。一部分成虫用于当代卵黄蛋白相对含量的测定,0 -84 h 内每隔 12 h 吸取的成虫进行实验;另一部分一直在25℃条件下培养并产卵,孵化出的幼虫长到成虫后同样在0 -84 h 内每隔12 h 吸取的成虫进行实验,检测 F_1 代成虫体内的卵黄蛋白相对含量。

1.2 胚胎发育过程中西花蓟马卵的形态观察及其卵巢结构观察

西花蓟马通过锯型产卵器将卵产于植物组织内部,很难大量收集虫卵并进行实验应用。本人

提供一种收集西花蓟马卵的方法（专利申请号：201510519793.2），可以实现西花蓟马卵的大量收集。选用二分隔塑料培养皿，用镊子去掉培养皿底面；将 parafilm 膜密封在培养皿顶端；在 parafilm 膜上滴蜂蜜，将西花蓟马雌成虫置于 parafilm 膜上，将培养皿的另一端用保鲜膜封口，用解剖针扎满孔；然后将 parafilm 膜的一端放入盛水的培养皿盖中，让其产卵。每隔 12 h 在解剖镜下用挑针挑出部分卵，观察卵的形态特征，并进行显微摄影。

收集热激处理后羽化 7 – 10 d 左右西花蓟马成虫，短时浸泡于盛有 PBS 缓冲液的培养皿中，静置，收集底部的虫体；用细毛笔将虫体固定在盛有薄层缓冲液的凹玻片凹槽处，虫体的腹面向上，放于解剖境下解剖；用解剖针挑开腹部末端几节的节间膜；左手用镊子按住头部，右手用另一把镊子夹往腹部末端轻轻向后拉开，这样，整个生殖器官就可以完整地暴露在外，进行显微摄影（专利公开号：CN104146735A）。

1.3　西花蓟马卵黄蛋白的提取和纯化

参照改进的龚和等（1982）方法。收集刚产下的西花蓟马的卵（约 700 个），用预冷的 0.4 mol/L NaCl 溶液在冰浴条件下匀浆。匀浆液用冷冻离心机在 10 000 r/min 4℃条件下离心 20 min，取出上清夜。按 1∶8 ~ 1∶10（v/v）的比例加入预冷的重蒸水，4℃条件下静置过夜，使卵黄蛋白沉淀，再在 5 000 r/min 4℃条件下离心 20 min，弃去上清液，将所得的粗沉淀物溶于少量 0.4 mol/L NaCl 溶液，低速离心除去少量的不溶物质，所得上清液再按 1∶8 ~ 1∶10（v/v）的比例加入预冷的重蒸水，4℃条件下静置过夜，使卵黄蛋白再沉淀。如此反复 2 ~ 3 次后即可得到较纯的卵黄蛋白。

1.4　电泳

参照郭尧君和俞添（1996）的方法进行卵黄蛋白的 PAGE 分析；参照李玉民等（1999）的方法进行卵黄蛋白的 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 的标准蛋白由 TransGen Biotech 提供，分子量为 30 ~ 200 kDa。

样品制备参照衣维贤（2003）并略有改进。将提取后经纯化的卵黄蛋白用预冷的酶提取液（EDTA，0.10292 g；β-巯基乙醇，0.10391 mL；苯基硫脲，0.1040 g；用 pH 7.0 的磷酸缓冲液定容至 100 mL）配成供试样品混合液。PAGE 和 SDS-PAGE 加样前将供试样品与 2 倍样品缓冲液混合。SDS-PAGE 混合液在沸水浴中加热 5 min，取出冷至室温备用。电泳结束后，经固定、染色和脱色后便可看到深蓝色的蛋白条带。

1.5　卵黄蛋白的定性分析

卵黄蛋白脂蛋白染色方法参照郭建洋（2010），糖蛋白和磷酸化蛋白染色方法参照上海生工 Sangon Biotech 提供的蛋白染色试剂盒进行染色。

1.6　卵黄蛋白相对含量的测定

参照戴华国和衣维贤（2006）的研究方法。供试西花蓟马不同时期的成虫样品用预冷酶提取液在冰浴中用玻璃匀浆器匀浆后，4 000 r/min 4℃离心 30 min。一部分与一定量考马斯亮蓝 G250 混合（Bradford 蛋白浓度测定试剂盒），用 MK3 型酶标仪测定各样品在 595 nm 波长的 OD 值，根据标准曲线计算出样品的总蛋白浓度；另一部分进行 PAGE 电泳。电泳结束后，凝胶经固定、染色、脱色后，用解剖刀将凝胶上各个样品的卵黄蛋白条带切下，用 PAGE 胶蛋白微量回收试剂盒回收后，用酶标仪测定洗脱液在 595 nm 波长的 OD 值，根据蛋白质标准曲线计算出电泳样品中卵黄蛋白的相对浓度，从而得到卵黄蛋白相对浓度与样品总浓度的比值，即卵黄蛋白的相对含量。测定重复 3 次，相对含量取平均值。

1.7　数据分析

数据统计分析采用 Microsoft Excel 2010。各处理西花蓟马成虫卵黄蛋白相对含量通过 SPSS 19.0（IBM，Armonk，NY，USA）的 two-way ANOVA 方法和 Duncan 氏检验进行差异显著性分析。

2　结果

2.1　西花蓟马胚胎发育过程中形态观察

西花蓟马的初产的卵为白色，肾形，内部充满卵黄蛋白，表明光滑柔软（图 1：A）。0 – 12 h 时，卵体积变大，胚胎出现部分透明区域，顶端出现透明的卵泡（图 1：B，C）。12 – 24 h，虫体大致轮廓形成，顶端出现一对触角（图 1：D）。24 – 36 h 时，卵黄颗粒消失，腹部分节明显，头端乳白色斑点中央出现很小但清晰可见的红色眼点（图 1：E）。36 – 48 h 时，胚胎颜色进一步加深，呈淡黄褐色，眼点更加明显，胚胎增长基本充满整个卵壳体，内部器官作用清晰可见（图 1：F）。48 – 60 h，卵色加深至淡褐色，腿节、胫节和跗节初步显现（图 1：G）。60 – 72 h 时，尾部和头胸部的附肢不断抖动，体内的体液流动，幼体破膜而出（图 1：H）。

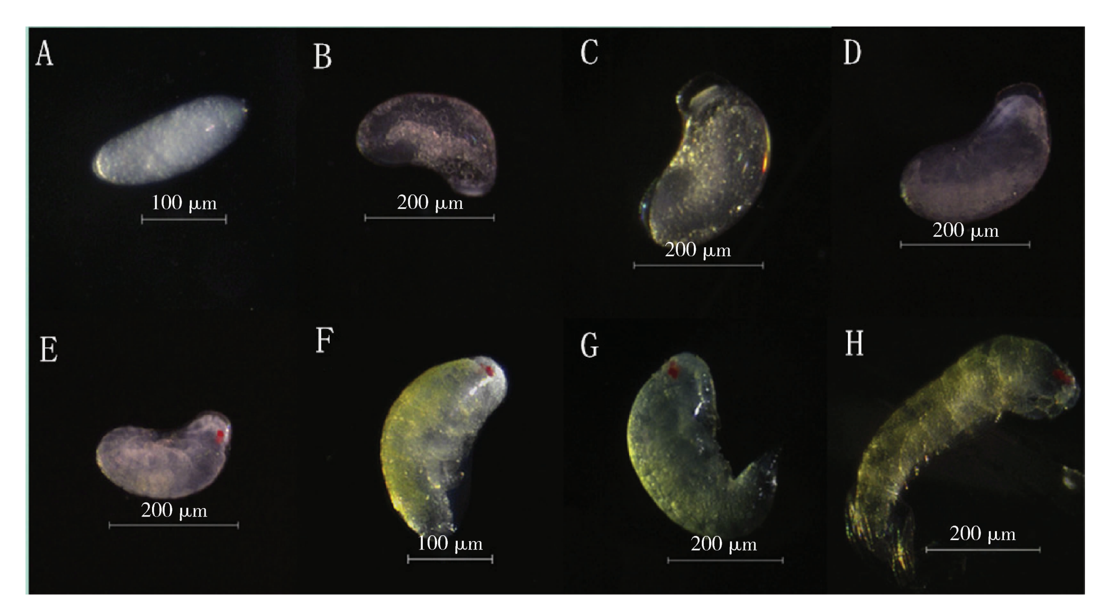


图 1 西花蓟马胚胎发育过程中卵的外部形态

Fig. 1 Change in morphology of eggs during embryo development of *Frankliniella occidentalis*

A: 0 h; B, C: 0 – 12 h; D: 12 – 24 h; E: 24 – 36 h; F: 36 – 48 h; G: 48 – 60 h; H: 60 – 72 h.

2.2 高温热激对西花蓟马成虫卵巢结构的影响

正常情况下西花蓟马卵巢管数量为 8 条，每个卵巢管有正常的卵室，卵巢发育正常(图 2: A)。亲代幼虫经过高温热激后发现其成虫卵巢结构受到影响，主要表现卵巢管数量的减少，且温度越高，影响越严重。41℃高温热激后发现卵巢管数量会减少到 7 条(图 2: D)；45℃高温热激后卵巢管数量会减少到 7 条，甚至 6 条(图 2: B, C)。亲代成虫经过高温热激后，主要对卵巢管和卵的结构造成影响，如卵巢管干瘪和胚胎发育畸形(图 2: E, F)。

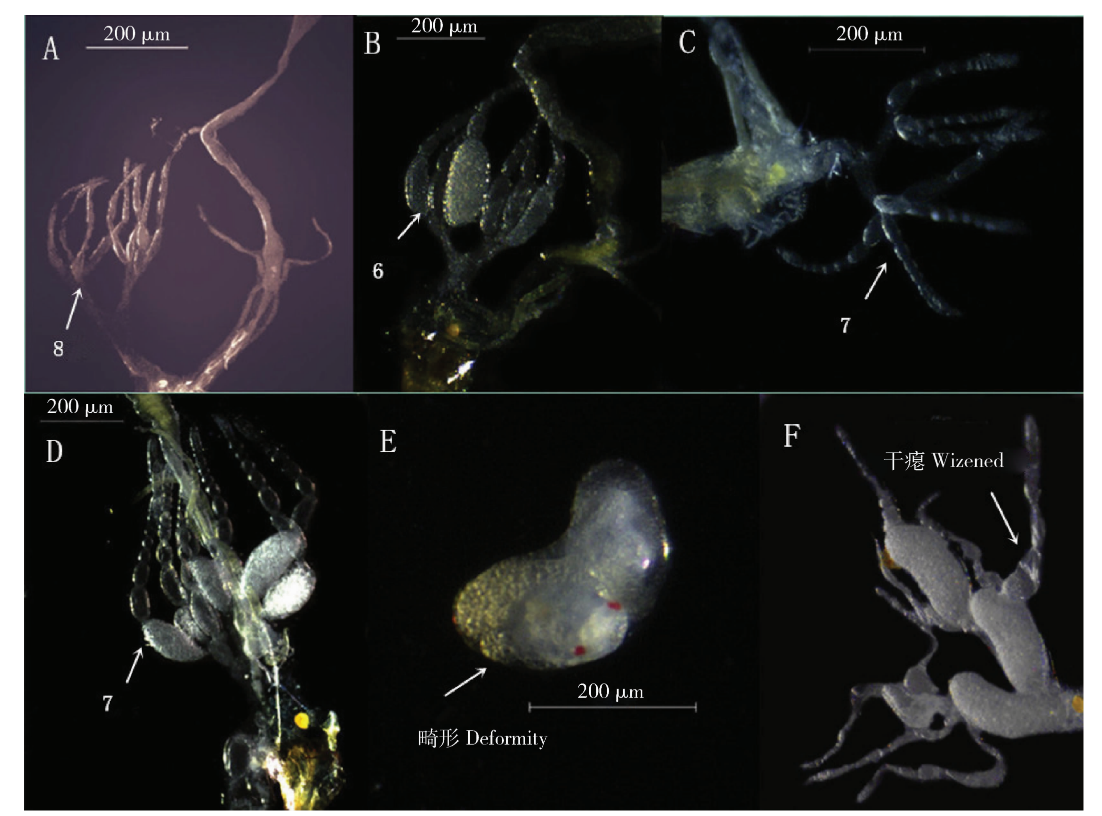


图 2 西花蓟马卵巢和胚胎结构图

Fig. 2 Structure of ovary and embryo of *Frankliniella occidentalis*

A: 对照组卵巢结构图 Ovary structure of the control; B – F: 高温处理后的卵巢和胚胎结构图 Ovary and embryo structure after high temperature heat shock. 箭头外数字示卵巢管数。The number beside the arrow indicates the number of ovarian tubes.

2.3　西花蓟马卵黄蛋白的存在检验及分析

利用蛋白 Native-PAGE 和 SDS-PAGE 方法对西花蓟马卵蛋白提取物检测发现,卵的 PAGE 胶蛋白电泳得到单一蛋白条带（图 3：A）。卵的蛋白提取物经 SDS-PAGE,得到 3 条清晰的蛋白条带（图 3：B）,表明该蛋白由大小 3 个亚基组成,且 3 个亚基的分子量分别为 116,70 和 47 kDa（图 4：A）。

雌成虫和雄成虫蛋白提取物进行 SDS-PAGE 电泳,发现雌成虫体内有与卵的提取物相同分子量的蛋白条带（图 3：D）,而在雄成虫体内未检测到类似的蛋白（图 3：E）。推测卵内的卵黄蛋白与雌虫中的卵黄原蛋白的亚基组成相似,为雌性所特有蛋白。卵黄蛋白提取物经 SDS-PAGE 电泳后,对其进行糖蛋白、脂蛋白和磷酸化蛋白化学性质分析发现,西花蓟马卵黄蛋白为一个磷酸化、糖基化的脂蛋白（图 4：B, C, D）。

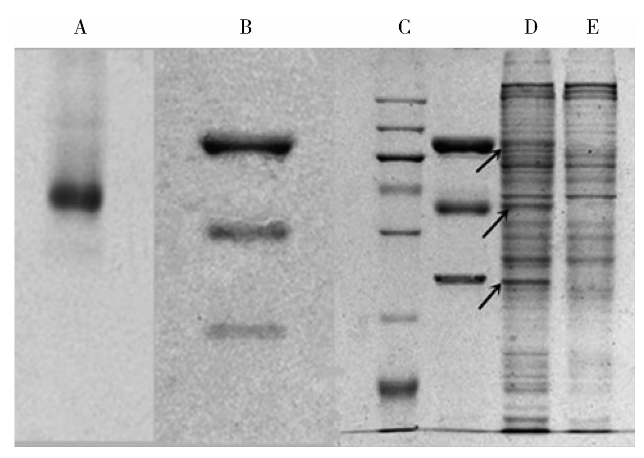


图 3　西花蓟马卵黄蛋白 PAGE 电泳图（A）及 SDS-PAGE 电泳图（B－E）

Fig. 3　Native-PAG analysis (A) and SDS-PAGE analysis (B－E) of yolk protein in *Frankliniella occidentalis*

A, B：卵 Egg；C：蛋白质标准分子量（从上到下条带大小分别为 200, 150, 100, 80, 60, 40 和 30 kDa）Protein molecular weight marker (200, 150, 100, 80, 60, 40 and 30 kDa from top to bottom)；D：雌成虫 Female adult；E：雄成虫 Male adult. 箭头表示目的蛋白。The arrows indicate the target protein.

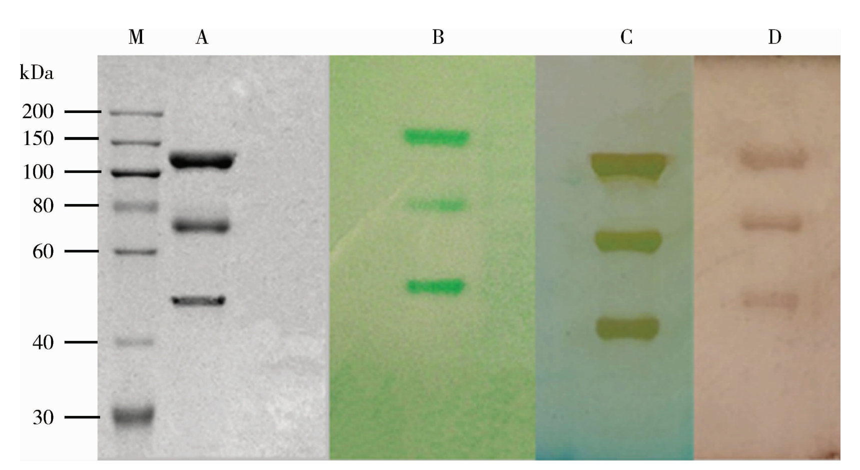


图 4　西花蓟马卵黄蛋白亚基分子量确定（A）及磷酸化蛋白（B）、糖蛋白（C）和脂蛋白（D）染色

Fig. 4　Analysis of molecular weight (A), phosphorylation (B), glycosylation (C) and lipoprotein (D) of yolk protein in *Frankliniella occidentalis*

M：分子量标准 Molecular weight marker.

2.4　西花蓟马胚胎及若虫发育过程中卵黄蛋白含量分析

西花蓟马的卵黄蛋白随着胚胎发育逐渐被利用（图 5：A, B）。西花蓟马从卵产出至胚胎发育 36 h 之内,卵黄蛋白相对含量变化不大;36 h 后,卵黄蛋白相对含量明显下降。72 h 后进入 1 龄幼虫阶段,此时还可以检测到虫体内的卵黄蛋白,之后卵黄蛋白含量几乎呈直线下降状态;到 120 h 时（此时为 1 龄末期）,其体内卵黄蛋白相对含量几乎为 0（图 6）。同时,在预蛹和蛹期也没有检测到卵黄蛋白的存在（图 5：C）

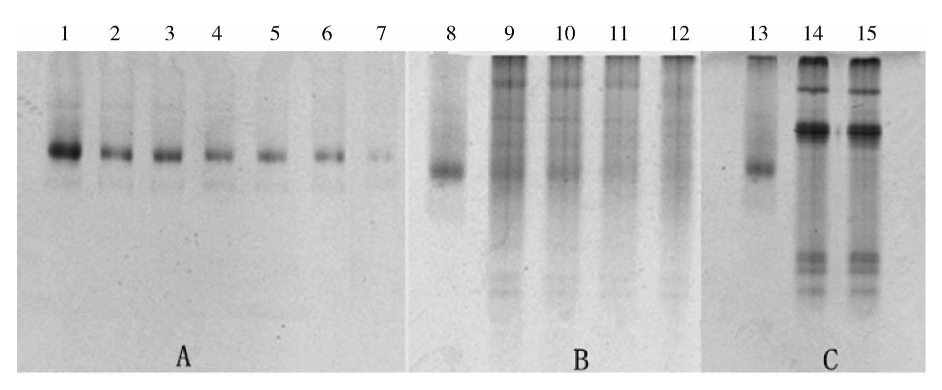


图 5　西花蓟马胚胎(A),1 龄若虫不同发育阶段(B),预蛹和蛹(C)的卵黄蛋白 Native-PAGE 电泳图

Fig. 5　Native-PAGE analysis of yolk protein in embryo (A), different developmental stages of the 1st instar nymphs (B), prepupae and pupae (C) of *Frankliniella occidentalis*

1: 0 h; 2: 0 – 12 h; 3: 12 – 24 h; 4: 24 – 36 h; 5: 36 – 48 h; 6: 48 – 60 h; 7: 60 – 72 h; 8,13: 胚胎的卵黄蛋白, 以标注不同发育阶段虫态体内的卵黄蛋白 Yolk protein of embryo used to mark the yolk protein in different developmental stages of insect; 9: 72 – 84 h; 10: 84 – 96 h; 11: 96 – 108 h; 12: 108 – 120 h; 14:预蛹 Prepupa; 15:蛹 Pupa.

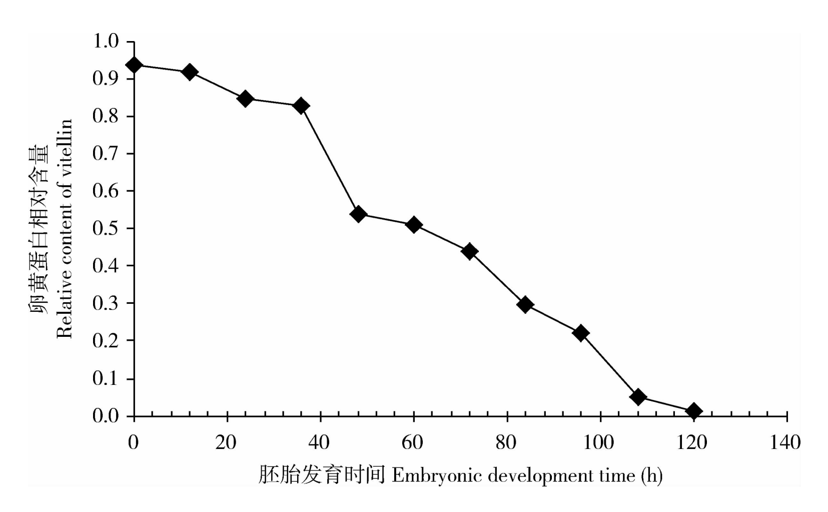


图 6　西花蓟马胚胎发育过程中卵黄蛋白含量的变化

Fig. 6　Change in yolk protein content during embryo development of *Frankliniella occidentalis*

2.5　高温热激西花蓟马不同虫态对其当代成虫体内卵黄蛋白相对含量的影响

如图 7 和 8 所示,25℃对照组西花蓟马成虫体内的卵黄蛋白相对含量在羽化 48 h 内上升较快,在第 48 – 60 小时保持较高的水平,并且此时卵黄蛋白相对含量最多;60 h 之后,卵黄蛋白相对含量下降($F_{(6,14)} = 146.69$, $P < 0.0001$)。41 和 45℃高温热激 1 龄(图 7: A)、2 龄若虫(图 7: B)和预蛹(图 8: A)后,其成虫体内卵黄蛋白相对含量在第 60 – 72 小时最多;72 h 之后,卵黄蛋白相对含量下降(1 龄若虫, 41℃: $F_{(6,14)} = 396.62$, $P < 0.0001$; 45℃: $F_{(6,14)} = 102.56$, $P < 0.0001$。2 龄若虫, 41℃: $F_{(6,14)} = 994.93$, $P < 0.0001$; 45℃: $F_{(6,14)} = 213.49$, $P < 0.0001$。预蛹, 41℃: $F_{(6,14)} = 1\ 110.94$, $P < 0.0001$; 45℃: $F_{(6,14)} = 1\ 771.09$, $P < 0.0001$)。但 41 和 45℃高温热激蛹期后,发现其成虫体内卵黄蛋白相对含量变化和对照一致(41℃: $F_{(6,14)} = 235.43$, $P < 0.0001$; 45℃: $F_{(6,14)} = 205.04$, $P < 0.0001$)(图 8: B)。

41 和 45℃高温热激 1 龄、2 龄若虫和预蛹后,成虫羽化最初 12 h 内,其体内卵黄蛋白相对含量都和对照不存在显著性差异。然而,在成虫羽化 24 h 后可以看出,高温热激的 1 龄和 2 龄若虫,其成虫体内的卵黄蛋白相对含量随着热激温度的升高降低得越显著(1 龄若虫, 24 – 36 h: $F_{(2,6)} = 90.89$, $P < 0.0001$; 36 – 48 h: $F_{(2,6)} = 22.17$, $P = 0.002$; 48 – 60 h: $F_{(2,6)} = 26.62$, $P = 0.001$; 60 – 72 h: $F_{(2,6)} = 13.03$, $P = 0.007$; 72 – 84 h: $F_{(2,6)} = 427.87$, $P < 0.0001$。2 龄若虫, 24 – 36 h: $F_{(2,6)} = 55.27$, $P < 0.0001$; 36 – 48 h: $F_{(2,6)} = 27.33$, $P = 0.001$; 48 – 60 h: $F_{(2,6)} = 14.16$, $P = 0.005$; 60 – 72 h: $F_{(2,6)} = 11.06$, $P = 0.01$; 72 – 84 h: $F_{(2,6)} = 836.47$, $P <$

0.0001)；高温热激预蛹，发现两处理间成虫体内卵黄蛋白相对含量不存在显著性差异。41 和 45℃高温热激蛹期，发现其成虫体内卵黄蛋白相对含量在任意时间都和对照不存在显著性差异。

如表 1 所示，双因素分析温度、虫态以及温度 * 虫态交互作用对不同发育阶段成虫体内卵黄蛋白相互含量的影响，发现成虫在最初羽化 12 h 没有影响，其他时间段均发现对成虫体内卵黄蛋白相对含量存在显著影响。

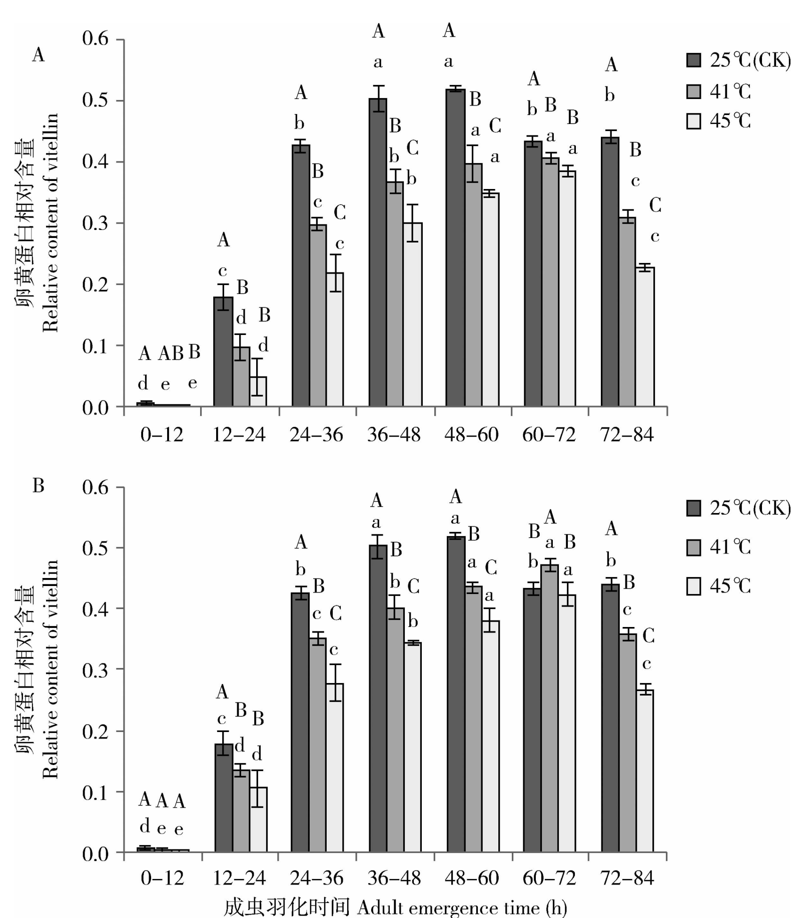


图 7　41 和 45℃高温热激西花蓟马 1 龄（A）和 2 龄若虫（B）后其当代不同发育阶段成虫体内卵黄蛋白相对含量的变化

Fig. 7　Change in the relative content of yolk protein in F_0 generation adults of *Frankliniella occidentalis* at different developmental stages after the 1st (A) and 2nd instar nymphs (B) were subjected to 41 and 45℃ heat shock

不同小写字母表示相同温度不同时间段间差异显著；不同大写字母表示相同时间段不同温度间差异显著（$P<0.05$，Duncan 氏检验）；图 8 同。Different lowercase letters indicate significant differences between different time periods in the same temperature; different capital letters indicate significant difference between different temperature in the same time period ($P<0.05$, Duncan's test). The same for Fig. 8.

表 1　双因素分析温度、虫态以及温度 * 虫态交互作用对当代不同发育阶段西花蓟马成虫体内卵黄蛋白相互含量的影响

Table 1　Two-way analysis of the effect of temperature, insect stages and temperature * insect stages on the relative content of yolk protein in F_0 generation adults of *Frankliniella occidentalis* at different developmental stages

	成虫羽化时间 Adult emergence time (h)						
	0 – 12	12 – 24	24 – 36	36 – 48	48 – 60	60 – 72	72 – 84
温度 Temperature	∞	25.880 **	120.931 **	41.585 **	26.379 **	12.923 **	730.454 **
虫态 Developmental stage	∞	17.891 **	90.550 **	24.185 **	18.543 **	57.265 **	483.503 **
温度 * 虫态 Temperature * developmental stage	∞	6.084 *	27.671 **	7.782 **	5.256 *	17.664 **	157.618 **

** $P<0.0001$；* $P<0.001$；∞：没有显著性差异 No significant difference. 数值表示 F 值。Data represent the F value.

2.6　41℃和 45℃高温热激西花蓟马不同虫态对其 F_1 代成虫体内卵黄蛋白相对含量的影响

从表 2 中可以看出，41℃高温热激西花蓟马各龄期若虫后，并没有对 F_1 代成虫体内卵黄蛋白相对含量造成影响。然而，45℃高温热激西花蓟马 1 龄、2 龄若虫后，对其 F_1 代成虫体内卵黄蛋白相对含量

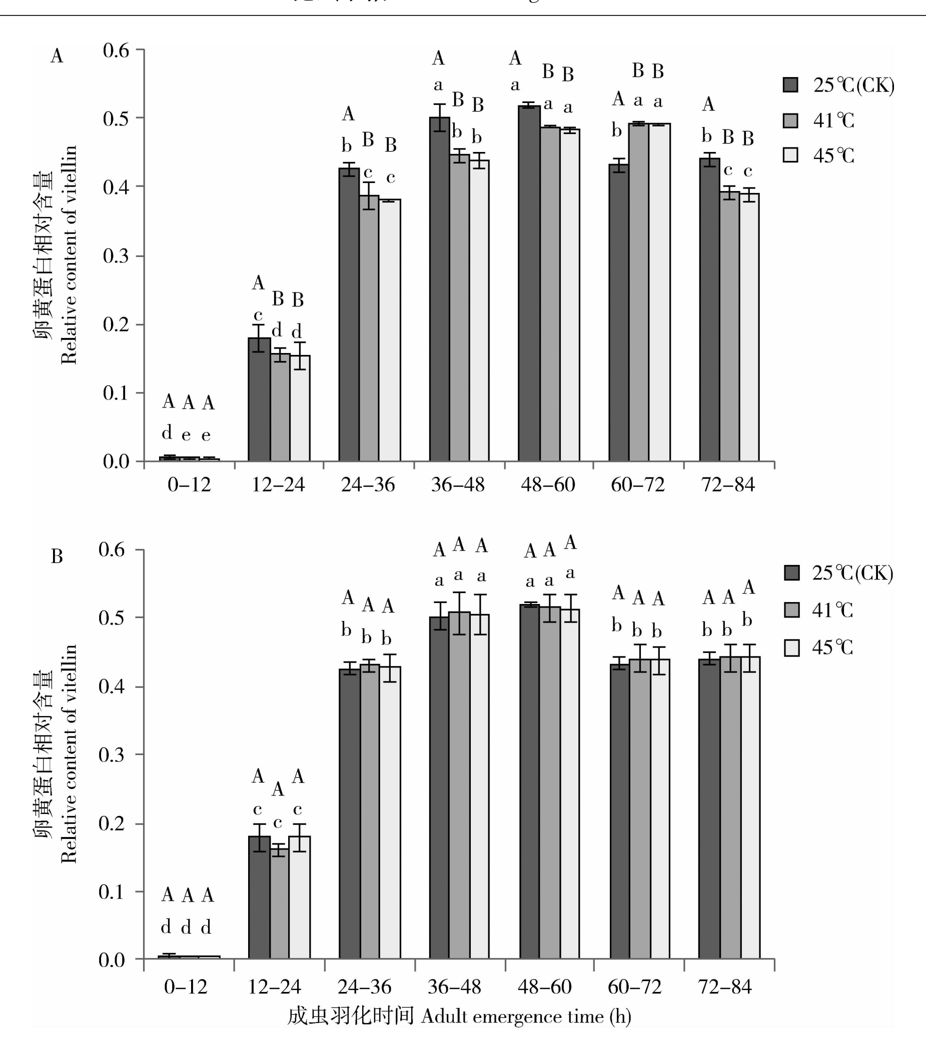


图 8 41 和 45℃高温热激西花蓟马预蛹(A)和蛹(B)后其当代不同发育阶段成虫体内卵黄蛋白相对含量的变化

Fig. 8 Change in the relative content of yolk protein in F_0 generation adults of *Frankliniella occidentalis* at different developmental stages after the prepupae (A) and pupae (B) were subjected to 41 and 45℃ heat shock

仍然存在显著影响,而热激预蛹和蛹期的若虫其 F_1 代成虫体内卵黄蛋白相对含量没有受到影响(1 龄若虫,0 - 12 h: $F_{(2,6)}$ = 5.14, P = 0.005; 12 - 24 h: $F_{(2,6)}$ = 19.08, P = 0.003; 24 - 36 h: $F_{(2,6)}$ = 112.72, P < 0.0001; 36 - 48 h: $F_{(2,6)}$ = 25.02, P = 0.001; 48 - 60 h: $F_{(2,6)}$ = 25.54, P = 0.001; 60 - 72 h: $F_{(2,6)}$ = 19.36, P = 0.002; 72 - 84 h: $F_{(2,6)}$ = 449.35, P < 0.0001。2 龄若虫,0 - 12 h: $F_{(2,6)}$ = 2.95, P = 0.128; 12 - 24 h: $F_{(2,6)}$ = 9.17, P = 0.015; 24 - 36 h: $F_{(2,6)}$ = 57.44, P < 0.0001; 36 - 48 h: $F_{(2,6)}$ = 31.19, P = 0.001; 48 - 60 h: $F_{(2,6)}$ = 14.22, P = 0.005; 60 - 72 h: $F_{(2,6)}$ = 5.93, P = 0.005; 72 - 84 h: $F_{(2,6)}$ = 630.82, P < 0.0001)。

3 讨论

自从 Telfer (1954) 首次在惜古比天蚕蛾 *Hyalophora cecropia* 中发现雌性特异性蛋白,Pan 等 (1969) 命名此蛋白为卵黄原蛋白以来,昆虫的卵黄发生及内分泌调控一直是昆虫生殖生理学研究工作中的核心问题。昆虫卵黄蛋白可根据亚基分子量的大小分为 3 种类型。第 1 类是具有大、小 2 种亚基基因的原始昆虫及现有的大多数昆虫,如家蚕 *Bombyx mori* (Yano *et al*., 1994)等;第 2 类,卵黄蛋白的前体只含有一个大分子量的亚基,主要包括一些膜翅目昆虫,如蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* (Dong *et al*., 2007)等;第 3 类,卵黄蛋白前体被酶解为几个分子量约为 80 ~ 110 kDa 的多肽,主要包括不完全变态昆虫,如点蜂缘蝽象 *Riptortus clavatus* (Hirai *et al*., 1998)等。本实验中,西花蓟马卵黄蛋白经提纯,通过 SDS-PAGE 电泳分析,西花蓟马的卵黄蛋白由大(116 kDa)和小(70 和 47 kDa)2 种亚基组成,属于第 1 类。

表 2　41℃和 45℃高温热激各龄期若虫、预蛹和蛹后 F_1 代不同发育时期成虫体内卵黄蛋白含量的变化

Table 2　Change in the relative content of yolk protein in F_1 generation adults of *Frankliniella occidentalis* at different developmental stages after nymphs of each instar, prepupae and pupae were subjected to 41 and 45℃ heat shock

热激处理虫龄 Developmental stage at heat shock	温度 Temperature	成虫羽化时间 Adult emergence time (h)						
		0 – 12	12 – 24	24 – 36	36 – 48	48 – 60	60 – 72	72 – 84
	25℃ (CK)	0.0062 ± 0.003 a	0.1791 ± 0.020 a	0.4258 ± 0.010 a	0.5024 ± 0.020 a	0.5191 ± 0.005 a	0.4326 ± 0.030 a	0.4401 ± 0.010 a
1 龄若虫 1st instar nymph	41℃	0.0053 ± 0.001 a	0.1736 ± 0.010 a	0.4231 ± 0.010 a	0.5017 ± 0.004 a	0.5139 ± 0.006 a	0.4411 ± 0.010 a	0.4302 ± 0.005 a
	45℃	0.0028 ± 0.001 ab	0.099 ± 0.002 b	0.3085 ± 0.001 b	0.3660 ± 0.004 b	0.4093 ± 0.005 b	0.4277 ± 0.007 a	0.3168 ± 0.010 b
2 龄若虫 2nd instar nymph	41℃	0.0054 ± 0.001 a	0.1744 ± 0.010 a	0.4245 ± 0.010 a	0.5111 ± 0.006 a	0.5181 ± 0.010 a	0.4432 ± 0.007 b	0.4318 ± 0.005 a
	45℃	0.0037 ± 0.001 ab	0.1382 ± 0.010 b	0.3609 ± 0.004 b	0.4180 ± 0.006 b	0.4480 ± 0.002 b	0.4540 ± 0.030 b	0.3687 ± 0.008 b
预蛹 Prepupa	41℃	0.0055 ± 0.001 a	0.1745 ± 0.010 a	0.4238 ± 0.010 a	0.5066 ± 0.010 a	0.5172 ± 0.010 a	0.4376 ± 0.010 b	0.4287 ± 0.007 a
	45℃	0.0047 ± 0.001 a	0.1671 ± 0.020 a	0.4119 ± 0.004 a	0.4966 ± 0.010 a	0.5098 ± 0.001 a	0.4395 ± 0.010 b	0.4323 ± 0.020 a
蛹 Pupa	41℃	0.0055 ± 0.001 a	0.1772 ± 0.006 a	0.4294 ± 0.010 a	0.4996 ± 0.003 a	0.5060 ± 0.003 a	0.4382 ± 0.006 a	0.4261 ± 0.005 a
	45℃	0.0049 ± 0.001 a	0.1707 ± 0.010 a	0.4146 ± 0.004 a	0.4926 ± 0.010 a	0.5075 ± 0.010 a	0.4429 ± 0.010 a	0.4458 ± 0.010 a

表中数据为平均值 ± 标准误；同列数据后不同小写字母表示同一虫态相同时间段间差异显著($P < 0.05$, Duncan 氏检验)。Data in the table are represented as mean ± *SE*. Values followed by different small letters within a column are significantly different in the same stage ($P < 0.01$, Duncan's test).

于长明等(1998) 研究发现,卵黄蛋白是雌虫所特有的,并在一定发育阶段由特定组织(一般为脂肪体) 产生,经血淋巴到达卵巢沉积而成。本实验通过 SDS-PAGE 分析,没有在雄虫体内发现卵黄蛋白;然而在初孵的西花蓟马 1 龄若虫体内检测到卵黄蛋白,从而推测这部分卵黄蛋白可能来源于雌成虫,卵内的卵黄蛋白在胚胎发育过程中被部分利用,另有部分转移到初孵若虫体内。在西花蓟马 2 龄若虫、预蛹及蛹期体内未测得卵黄蛋白, 从而证明西花蓟马的卵黄蛋白只存在于生殖期的雌成虫体内。

昆虫卵黄蛋白在雌成虫中含量丰富,卵黄的发生是卵巢成熟的关键,对研究胚胎发育等具有重要的生物学意义(Corona *et al.*, 2007)。关于卵黄蛋白在昆虫胚胎发育过程中作用的研究很少,一般认为卵黄蛋白在胚胎发育中有营养源、运输、机械支持等方面的作用。如卵黄蛋白可结合并转运核黄素、维生素 A、多种金属离子等,将它们运送至卵母细胞,为发育中的胚胎提供营养物质(Azuma *et al.*, 1993; Lachlan *et al.*, 1994)。Wolf-Neis 等(1976)通过将竹节虫 *Gongy10pus adyposus* 的胚胎移植到不含卵黄的培养液中,证明卵黄蛋白有运输某种必需物质的作用。彭宇等(2000)在研究真水狼蛛 *Pirata piraticus* 后也支持这一观点。本研究中发现西花蓟马胚胎发育过程中,卵黄蛋白的含量变化与褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(戴华国和衣维贤, 2006)及大草蛉 *Sympetrum croceolum*(陶淑霞, 2004)卵黄蛋白在胚胎发育过程中变化的结果相似,均支持卵黄蛋白为发育中的胚胎提供营养物质的观点。在卵产出母体 36 h 后, 发现卵黄蛋白被大量消耗, 其相对含量迅速下降,可能原因是胚胎发育进入身体结构形成阶段,导致新陈代谢旺盛。72 h 后, 若虫孵化, 并已开始取食,但卵黄蛋白的相对含量仍然继续减少,推测此时卵黄蛋白可能继续作为营养物质在消耗,保证虫态有足够的营养存活。也可能是卵黄蛋白转化为若虫体内某种缺乏但又必需的物质,以保证若虫的正常发育。

温度对雌虫生殖力及卵孵化率的影响是对生殖器官发育和卵黄蛋白合成影响的最终表现(王竑晟等, 2006)。Wang 等(2014)的研究发现,短时高温暴露西花蓟马幼虫和成虫后,发现亲代繁殖力显著降低。本研究发现,短时高温暴露西花蓟马幼虫和成虫后,其当代成虫卵巢结构和胚胎发育均受到显著影响,该结果与 Daumal 和 Boinel (1994)对地中海粉斑螟 *Ephestia kuehniella* 相关研究结果相一致。说明高温影响了卵巢及胚胎的发育,进而影响了生殖力。Jiang 等(2014)的研究发现,45℃高温热激西花蓟马 2 龄若虫和成虫后,成虫产卵前期明显延迟。本研究结果发现,25℃培养的西花蓟马种群,成虫卵黄蛋白含量在第 48 – 60 小时内达到最大值,60 h 后,卵黄蛋白含量开始降低,原因可能是此时西花蓟马开始产卵。然而,短时高温暴露西花蓟马 1 龄、2 龄若虫及预蛹后,发现其当代成虫卵黄蛋白相对含量在第 60 – 72 小时内达到最大值,72 h 后,卵黄蛋白含量开始降低,推测可能高温使得卵黄蛋白的合成速度受到影响,进而推迟了成虫的产卵。另外,发现短时高温热激导致卵巢内卵黄蛋白含量减少,原因可能是高温影响体内的能量代谢水平和激素水平从而影响卵黄生成和卵黄的沉积(Bryant and

Raikhel, 2011)。同时发现温度对卵黄蛋白合成的影响与开始高温处理的西花蓟马幼虫期发育阶段相关,这与高温对天蚕 *Antheraea yamamai*(叶恭银等, 2000)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*(衣维贤, 2003)等的卵巢发育和卵子发生影响的研究中结果一致。推测原因可能是高温阻止卵巢发育与其阻止了昆虫卵黄蛋白的发生有关。生态学实验中的研究发现,高温热激西花蓟 2 龄幼虫和 1 日龄成虫后,会对其连续多代的繁殖力造成影响,而热激蛹期对其成虫繁殖力没有造成很大的影响(另文发表)。本研究中发现,45℃高温热激 1 龄、2 龄若虫,其 F_1 代成虫体内卵黄蛋白含量和对照相比显著降低,推测是其繁殖力降低的原因之一;同时发现高温热激蛹期后,其成虫体内卵黄蛋白相对含量几乎没有受到影响,从而其成虫繁殖力没有受到很大的影响。

探明高温对昆虫繁殖影响的生理生化机制,以及其与昆虫的生长发育、繁殖、存活等的关系,有助于提高昆虫种群预测的准确性,也是了解高温对昆虫生命活动影响的根本途径。西花蓟马卵黄蛋白的有关作用尚需进一步研究。

参考文献(References)

Azuma M, Irie T, Seki T, 1993. Retinals and retinols induced by estrogen in the blood plasma of *Xenopus laevis*. *J. Exp. Biol.*, 178(1): 89-96.

Bryant B, Raikhel AS, 2011. Programmed autophagy in the fat body of *Aedes aegypti* is required to maintain egg maturation cycles. *PLoS ONE*, 6(11): e25502.

Byrne BM, Gruber M, Ab G, 1989. The evolution of egg yolk proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 53(1): 33-69.

Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA, Robinson GE, 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(17): 7128-7133.

Dai HG, Yi WX, 2006. Separation and characterization of vitellin of *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 49(1): 29-33. [戴华国, 衣维贤, 2006. 褐飞虱卵黄蛋白的分离及其生化特性. 昆虫学报, 49(1): 29-33]

Daumal J, Boinel H, 1994. Variability in fecundity and plasticity of oviposition behavior in *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(2): 250-256.

Dong SZ, Ye GY, Zhu JY, Chen ZX, Hu C, Liu S, 2007. Vitellin of *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae), a pupal endoparasitoid of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae): biochemical characterization, temporal patterns of production and degradation. *J. Insect Physiol.*, 53(5): 468-477.

Falchuk KH, Montorzi M, 2001. Zinc physiology and biochemistry in oocytes and embryos. *Biometals*, 14(3-4): 385-395.

Gong H, Zhai QH, 1979. Insect vitellogenin and vitellogenesis. *Acta Entomol. Sin.*, 22(2): 219-238. [龚和, 翟启慧, 1979. 昆虫卵黄原蛋白和卵黄发生. 昆虫学报, 22(2): 219-238]

Gong H, Zhang JZ, Zhai QH, 1982. Characteristics of the yolk protein of *Coccinella septempunctata* L. *Acta Entomol. Sin.*, 25(1): 9-15. [龚和, 张建中, 翟启慧, 1982. 七星瓢虫卵黄蛋白的理化性质. 昆虫学报, 25(1): 9-15]

Guo HF, Chen CK, Li GQ, Chen WW, Wang YC, 2002. Physiological effect of high temperature on fecundity in male cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Cotton Science*, 14(2): 85-90. [郭慧芳, 陈长琨, 李国清, 陈文武, 王荫长, 2002. 高温胁迫影响雄性棉铃虫生殖力的生理机制. 棉花学报, 14(2): 85-90]

Guo JY, 2010. Vitellogenesis and Sequences Analysis of Vitellogenin and Vitellogenin Receptor Gene in Whiteflies *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [郭建洋, 2010. 烟粉虱卵黄发生、卵黄蛋白及其受体基因序列的分析. 杭州: 浙江大学博士学论文]

Guo YJ, Yu T, 1996. New rapid semi-dry technique used in anode PAGE and cathod PAGE. *Prog. Biochem. Biophys.*, 23(4): 359-364. [郭尧君, 俞添, 1996. 阳极电泳和阴极电泳的快速半干新技术. 生物化学与生物物理学进展, 23(4): 359-364]

Hagedorn HH, Kunkel JG, 1979. Vitellogenin and vitellin in insect. *Annu. Rev. Entomol.*, 24(5): 475-505.

Hirai M, Watanabe D, Kiyota A, Chinzei Y, 1998. Nucleotide sequence of vitellogenin mRNA in the bean bug, *Riptortus clavatus*: analysis of processing in the fat body and ovary. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 28(8): 537-547.

Jiang S, Zhang NQ, Wang SF, Li J, Zhang B, Zheng CY, 2014. Effects of heat shock on life parameters of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) F_1 offspring. *Florida Entomologist*, 97(3): 1157-1166.

Lachlan IM, Nimpf J, Schneider WJ, 1994. Avian riboflavin binding protein binds to lipoprotein receptors in association with vitellogenin. *J. Biol. Chem.*, 269(39): 24127-24132.

Li YM, Li YQ, Chen J, 1999. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. In: He ZX, Zhang SZ eds. Electrophoresis. Science Press, Beijing. 127-139. [李玉民, 李育庆, 陈军, 1999. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳. 见: 何忠效, 张树政 主编. 电泳. 北京: 科学出版社. 127-139]

Mahroof R, Subramanyam B, Flinn P, 2005. Reproductive performance of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) exposed to the minimum heat temperature as pupae and adults. *J. Econ. Entomol.*, 98(2): 626-633.

Pan ML, Bell WJ, Telfer WH, 1969. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science*, 165(1): 393-394.

Peng Y, Hu C, Zhao JZ, 2000. Studies on vitellin of water wolf spider *Pirata piraticus*. *Journal of Zhejiang University (Agricultural & Life Sciences)*, 26(1): 69-74. [彭宇, 胡萃, 赵敬钊, 2000. 真水狼蛛 *Pirata piraticus* 卵黄蛋白的研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 26(1): 69-74]

Richard DS, Watkins NL, Serafin RB, Gilbert LI, 1998. Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. *J.*

Insect Physiol., 44: 637 – 644.

Rinehart JP, Yocum GD, Denlinger DL, 2000. Thermotolerance and rapid cold hardening ameliorate the negative effects of brief exposures to high or low temperatures on fecundity in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Entomol.*, 25(4): 330 – 336.

Saxena BP, Sharma PR, Thappa RK, Tikku K, 1992. Temperature induced sterilization for control of three stored grain beetles. *J. Stored Prod. Res.*, 28(1): 67 – 70.

Tao SX, 2004. Studies on Vitellin and Vitellogensis of *Chrysopa septempunctata* Wesmael. PhD Dissertation, Northeast Forestry University, Harbin. [陶淑霞, 2004. 大草蛉卵黄蛋白及卵黄发生的研究. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文]

Telfer WH, 1954. Immunological studies of insect metamorphosis II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the cecropia silkworm. *J. Gen. Physiol.*, 37(4): 539 – 558.

Wang FS, Xu HF, Cui F, 2006. Effect of high temperature on fecundity and ovary development of beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 19: 916 – 919. [王竑晟, 徐洪富, 崔峰, 2006. 高温处理对甜菜夜蛾雌虫成虫期生殖力及卵巢发育的影响. 西南农业学报, 19: 916 – 919]

Wang JC, Zhang B, Li HG, Wang JP, Zheng CY, 2014. Effects of exposure to high temperature on *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), under arrhenotoky and sexual reproduction condition. *Florida Entomologist*, 97(2): 504 – 510.

Wolf-Neis R, Kirchner C, Koch P, Seitz KA, 1976. Immunohistological studies on the distribution of yolk protein in the stick insect (*Carausius morosus*). *J. Insect Physiol.*, 22(6): 865 – 869.

Woodhead AP, Stay B, 1989. Neural inhibition of corpora allata in protein-deprived *Diploptera punctata*. *J. Insect Physiol.*, 35(5): 415 – 421.

Yano K, Sakurai MT, Watabe S, Izumi S, Tomino S, 1994. Structure and expression of mRNA for vitellogenin in *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1218(1): 1 – 10.

Ye GY, Hu C, Gong H, 1999. Effect of a high temperature on vitellogenesis in the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae). *Entomologia Sinica*, 6(3): 242 – 252.

Ye GY, Hu C, Gong H, 2000. Effect of high temperature on ovarian growth and development in the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturiidae), a precious silkworm. *Acta Ecologica Sinica*, 20(3): 490 – 494. [叶恭银, 胡萃, 龚和, 2000. 高温对珍贵绢丝昆虫——天蚕卵巢生长发育的影响. 生态学报, 20(3): 490 – 494]

Yi WX, 2003. Characterization of Vitellin and Effectation of High Temperature on Its Vitellogenesis in Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens* (Stål)). MSc Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. [衣维贤, 2003. 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål)卵黄蛋白的性质及高温对卵黄蛋白发生的影响. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]

Yu CM, Li CW, Liu Q, 1998. Development of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of vitellin content in *Blattella germanica*. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 5(4): 246 – 252. [于长明, 李成文, 刘泉, 1998. ELISA 测定德国小蠊卵黄蛋白含量方法的建立. 寄生虫与医学昆虫学报, 5(4): 246 – 252]

(责任编辑: 赵利辉)